Agilent 2100 バイオアナライザでの Agilent Fish ID ソリューションによる様々な肉種の特定

アプリケーションノート

食品の真正性、食品試験

著者

K. Bhagavatula, L. Kelly, J. Zhang
Agilent Technologies, Inc.
Global Food Team
Santa Clara, CA 95051
USA

S. Müller
Agilent Technologies, Inc.
Global Food Team
Hewlett-Packard-Str. 8
76337 Waldbronn
Germany

概要

食品加工工場では、生産工程の一部として様々な動物由来の原材料が使用されており、これらの原材料が同じ生産ラインで使用されることがあります。Agilent Fish ID ソリューションは、様々な加工レベルの食品サンプルから魚種を特定するために開発されました。このアプリケーションノートでは、Agilent Fish ID ソリューションを用いて、魚以外の生物種、哺乳類および鳥類由来の DNA が乳製品や肉から検出可能かを検証しました。

はじめに

Agilent Fish ID ソリューションは、未調理、調理済み、その他の方法で加工された魚の加工品から魚種を迅速かつ容易に特定するために導入されました。食品メーカーは、製品の加工に乳製品、哺乳類または鳥類の肉を含む多様な原材料を使用しています。これらは原材料として、または生産工程での混入物として、魚介類の加工工程の一部に含まれる場合があります。このアプリケーションノートでは、Fish ID ソリューションを用い、肉サンプルから哺乳類または鳥類の DNA を検出可能かどうかを調べました。

Agilent Technologies

材料および方法

肉サンプル

ウシ、ブタ、イノシシ、ヒツジ、ニワトリ、シチメンチョウ、およびアヒル肉のサンプルを食料品店、または精肉店で入手しました。

肉組織からの DNA 抽出

Fish ID Ensemble に含まれる Agilent DNA Isolation Kit を使用し DNA を抽出しました。DNA 濃度と 260/280、260/230 比を Nanodrop ND-2000 分光光度計 (Thermo Fisher Scientific) を使用して確認しました。

Cytb ターゲットシーケンスの増幅

Cytb ターゲットシーケンスを増幅するため、Agilent PCR-RFLP Fish ID Kit のプロトコルに従って 1 µl の DNA を使用しました。ポジティブコントロールとして、キットに含まれるタイセイヨウサケの DNA をマニュアルに従って増幅しました。すべてのサンプルが正しく増幅されたか確認するため、サンプルとネガティブコントロール (NTC) を Agilent 2100 バイオアナライザの DNA 1000 Assay にて検証しました。

PCR 産物の制限酵素処理

Agilent PCR-RFLP Fish ID Kit のプロトコルに従って、PCR 増幅産物の 2.5 µL をキットに含まれる酵素 *Dde* I、*Hae* III、および *Nla* III で制限酵素処理しました。

バイオアナライザを使用した制限酵素処理断片のパターン分析

制限酵素処理されたサンプルとポジティブコントロールのサケ DNA を、プロトコルに従って DNA 1000 Kit を使用し解析しました。サンプルごとに 3 つの独立した制限酵素処理産物を連続したウェルにロードし、1 チップあたり 4 種類のサンプルを泳動し、2100 バイオアナライザエキスパートソフトウェアを使用して分析しました。

結果

Fish ID ソリューションに含まれる Agilent DNA Isolation Kit を使用して、すべての組織サンプルから十分な収量と品質の DNA を得られました。組織ごとに 2 つの独立した DNA サンプルを、キットに含まれるサケのポジティブコントロール DNA とテンプレートを含まないネガティブコントロールと共に PCR で増幅しました。PCR の増幅産物を、DNA 1000 Assay を使用して 2100 バイオアナライザで検証しました (図 1)。哺乳類サンプルでは、サケのポジティブコントロールに類似した 1 つの明確な PCR 産物が得られました。シチメンチョウからは再現性のある 2 本のバンドが得られましたが、ニワトリおよびアヒルサンプルでは、多数の非特異的な増幅産物が得られました。

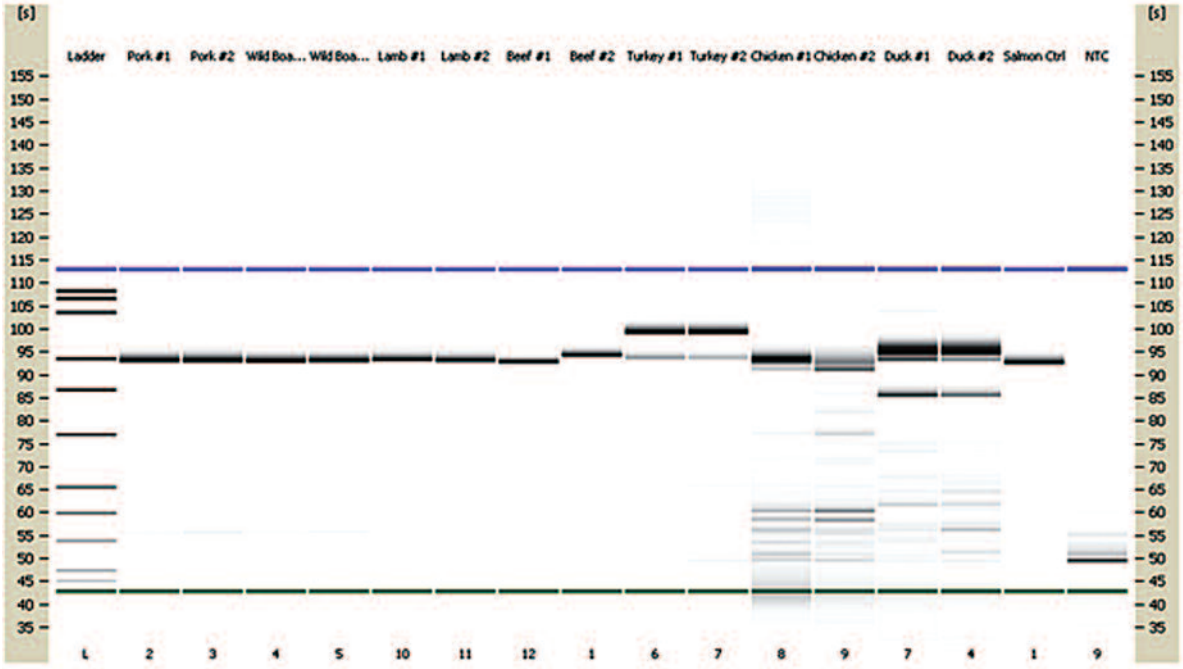

図 1: *Cytb* PCR の結果の分析。2 つの独立した肉由来の DNA サンプル、サケ (*S. salar*) のポジティブコントロール、およびテンプレートを含まないネガティブコントロールを DNA1000 Assay を使用してバイオアナライザで分析しました。ゲルイメージはエキスパートソフトウェアを使用してすべてのサンプルについてまとめた比較ファイルを示しています。レーン 1 : ラダ、レーン 2 + 3 : ブタ、レーン 4 + 5 : イノシシ、レーン 6 + 7 : ヒツジ、レーン 8 + 9 : ウシ、レーン 10 + 11 : シチメンチョウ、レーン 12 + 13 : ニワトリ、レーン 14 + 15 : アヒル、レーン 16 : *S. salar* ポジティブコントロール、レーン 17 : NTC

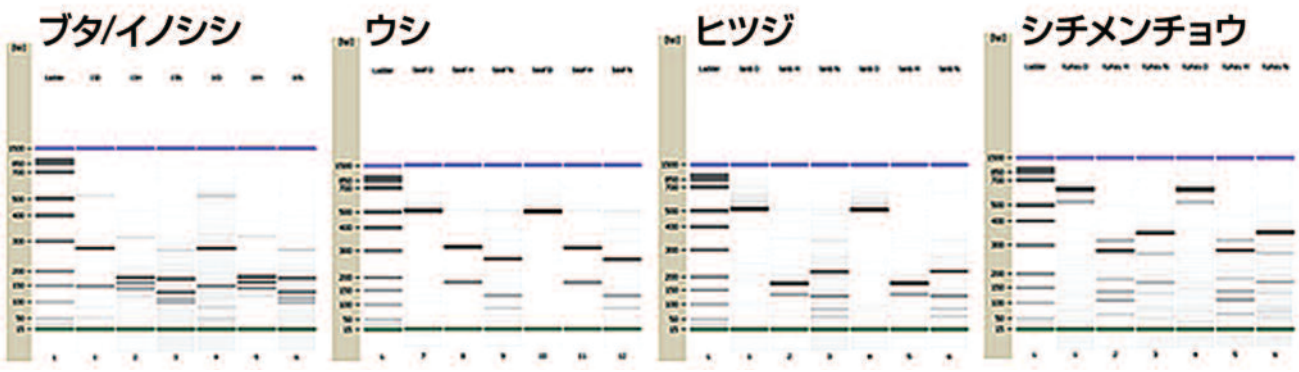

図 2. Agilent 2100 バイオアナライザでの制限酵素処理断片の分析。ゲルイメージは、ブタ、ウシ、ヒツジ、およびシチメンチョウの 2 つの独立した肉組織サンプルから得られた PCR 産物の制限酵素切断物についてパターンの組み合わせを示しています。各パネルは、左からラダ、サンプル 1 の *Dde* I、*Hae* III、および *Nla* III 切断パターン、続いてサンプル 2 の切断パターンを示しています。ブタとイノシシでは同じパターンが得られたため、ブタの結果だけを示しました。

PCR-RFLP Fish ID Kit のマニュアルに従って、NTC を除くすべての PCR 増幅物の制限酵素処理を行いました。PCR の結果から予測されるように、ニワトリとアヒルではいずれの場合も多くのフラグメントが得られ、決まったパターンは観察されませんでした (データ示さず)。哺乳類とシチメンチョウでは、独自の容易に特定できるパターンが得られました (図 2)。ブタとイノシシでは、同一のパターンの組み合わせが得られました。フラグメントのサイズを表 1 にまとめます。

表 1. ブタ、イノシシ、ウシ、ヒツジ、およびシチメンチョウのフラグメントサイズ (bp) と標準偏差。( ) 内の 132 bp フラグメントはシチメンチョウの *Nla* III 切断物に一貫して存在していましたが、設定されたピーク閾値よりも低かったため、エキスパートソフトウェアのデフォルトの設定では検出されませんでした。

	***Dde* I**	***Hae* III**	***Nla* III**
ブタ	276 ± 0.6, 149 ± 0.6	180 ± 1.3, 162 ± 1.3, 142 ± 1.7	175 ± 1.0, 130 ± 0.5, 109 ± 1.3, 98 ± 0.8
イノシシ	274 ± 1.0, 149 ± 0.8	181 ± 1.5, 162 ± 1.0, 143 ± 2.0	174 ± 0.8, 130 ± 0.8, 111 ± 1.0, 99 ± 0.6
ウシ	505 ± 6.0	313 ± 3.1, 180 ± 0.6	267 ± 1.7, 131 ± 0.6, 87 ± 0.5
ヒツジ	517 ± 4.2	178 ± 1.0, 171 ± 1.0, 135 ± 1.0	220 ± 1.3, 129 ± 1.0, 84 ± 0.8, 58 ± 0.5
シチメンチョウ	624 ± 0.7, 525 ± 0.7	319 ± 0.0, 280 ± 1.4, 180 ± 1.4, 137 ± 0.7, 110 ± 0.7, 64 ± 0.7	352 ± 1.4, 271 ± 0.7, 169 ± 0.7, (132 ± 0.7)

まとめ

プライマーが幅広い魚種をカバーするように設計されているため、魚以外の種も検出できると予想されました。数種類の一般的な哺乳類と鳥類の肉組織で検証を行ったところ、このキットを使用してブタ、ウシ、ヒツジを正しく特定できることがわかりました。これに対し、鳥類の *Cytb* は、哺乳類や魚類ものとは大きく異なるようです。シチメンチョウだけは容易に特定できる単純なパターンを示しましたが、2 つの異なる PCR 産物が増幅されました。大規模な肉種特定ソリューションには別のプライマー設計が必要です。また、異なるターゲットシーケンスも必要となります。

詳細情報

アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web サイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。
著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2011
Printed in Japan
June 28, 2011
5990-8452JAJP

Agilent Technologies